

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 631 829**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **88 07171**

⑤1 Int Cl⁴ : A 61 K 31/715; C 07 H 3/06.

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 30 mai 1988.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 48 du 1^{er} décembre 1989.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : INSTITUT PASTEUR. — FR.

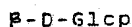
⑦2 Inventeur(s) : Jean-Paul Latge ; Drion Boucias ; Gerhard
Franz ; Bernard Fournet.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Lavoix.

⑤4 Exopolysaccharides fongiques ayant une activité immunostimulante, leur procédé d'obtention et composition
thérapeutique les contenant.

⑤7 L'invention a pour objet des exopolysaccharides fongiques
ayant une activité immunostimulante, comprenant des chaînes
de type glucane de formule



1



6

[$\beta\text{-D-Glcp-(1} \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1} \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1} \rightarrow 3)\text{-}]_n$
qui présentent entre elles des pontages, et éventuellement
des chaînes de type mannane
et ayant une masse moléculaire au moins égale à 5.10^5 .

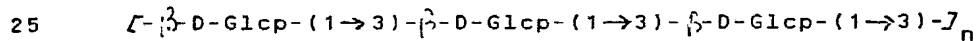
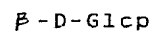
FR 2 631 829 - A1

La présente invention concerne des exopolysaccharides fongique ayant une activité immunostimulante chez les vertébrés qui peut être utilisée notamment dans le traitement des tumeurs.

5 On connaît déjà des glucanes ayant une activité immunostimulante qui sont utilisés dans le traitement de cancers. Parmi ces glucanes on peut citer le schizophyllane qui est produit par Schizophyllum commune (T. Matsuo et al, Drug Res. 32, 647, 1982). Ce
10 produit est décrit comme étant un bêta 1,6; bêta 1,3 glucane ayant une masse moléculaire de $4,5 \cdot 10^5$. Il a déjà été utilisé dans le traitement de différents types de cancer.

15 On a maintenant trouvé des exopolysaccharides qui présentent une activité supérieure à celle du Schizophyllane.

La présente invention a ainsi pour objet des exopolysaccharides fongiques ayant une activité immunostimulante, comprenant des chaînes de type glucane
20 de formule



qui présentent entre elles des pontages, et éventuellement des chaînes de type mannane et ayant une masse moléculaire au moins égale à $5 \cdot 10^5$.

30 Les exopolysaccharides selon l'invention peuvent être notamment produits par des souches de Nomuraea rileyi qui est un champignon imparfait, pathogène de nombreux lepidoptères défoliateurs, et notamment par des souches déposées ATCC 46372 et ATCC 52631.

Toutefois plus généralement ils peuvent être produits par des champignons pathogènes d'invertébrés capables d'excréter un polysaccharide stimulant les réactions de défense d'un invertébré.

5 La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention d'un exopolysaccharide selon l'invention qui consiste à cultiver une souche productrice de l'exopolysaccharide, à séparer par filtration le milieu de culture et à séparer par précipitation ou
10 ultrafiltration les exopolysaccharides du milieu de culture.

Le milieu de culture utilisé avec Nomuraea
rilevi peut être constitué de glucose (3 à 6% en poids) et d'extrait de levure (1 à 2% en poids). Mais
15 on peut également utiliser d'autres sources de carbone telles que des sirops de maïs et d'autres sources d'azote telles que des hydrolysats de protéine du type peptone.

La séparation par précipitation peut être
20 réalisée notamment par de l'éthanol.

La présente invention a en outre pour objet une composition thérapeutique comprenant les exopolysaccharides à titre de principe actif.

Les compositions thérapeutiques selon l'invention peuvent être administrées à l'homme ou aux
25 animaux par voie topique ou parentérale, et notamment par voie intramusculaire.

Elles peuvent être sous la forme de préparations solides, semi-solides ou liquides. Comme exemples, on peut citer les solutions ou suspensions injectables, les pommades, les collyres huileux ou
30 aqueux, les collutoires, les solutions nasales et otologiques, ainsi que les formes retard.

Dans ces compositions le principe actif est

généralement mélangé avec un ou plusieurs excipients pharmaceutiquement acceptables habituels bien connus de l'homme de l'art.

5 Les compositions thérapeutiques administrables par voie topique peuvent contenir notamment de 0,1 à 5% en poids du principe actif.

Les compositions thérapeutiques administrables par voie orale ou parentérale peuvent contenir notamment de 1% à 60% en poids de principe actif.

10 La quantité de principe actif administré dépend évidemment du patient qui est traité, de la voie d'administration et de la sévérité de la maladie.

On décrira ci-après plus en détail l'obtention des exopolysaccharides selon l'invention, leurs caractéristiques et leurs propriétés.

15 1) Culture de Nomuraea rileyi et séparation des exopolysaccharides.

On cultive une souche de Nomuraea rileyi (ATCC 46372) dans un milieu de culture comprenant 3% de glucose et 1% d'extrait de levure dans des conditions de fermentation submergée. A cet effet, on opère dans un fermenteur en culture discontinue dans les conditions suivantes : 600 tpm, 0,1-1,0 vvm (volume d'air/volume de milieu/minute), 25°C.

25 Après 48 h de croissance, le milieu de culture et le mycélium sont séparés par filtration. Le filtrat de culture est précipité par éthanol (3-4 volumes d'éthanol/1 vol. filtrat). Après plusieurs lavages à l'alcool, le précipité est conservé à -20°C en présence d'alcool.

30 2) Composition et caractéristiques des exopolysaccharides.

Les exopolysaccharides sont exclusivement composés d'hexoses (avec, en fonction des opérations,

des doses variables mais toujours très faibles de protéines <1% des exopolysaccharides, provenant probable-ment de la lyse cellulaire). L'analyse de la composition centésimales du polysaccharide et des liaisons existant entre les différentes unités a été effectuée à l'aide des techniques suivantes :

a) Composition des monosaccharides.

La teneur en hexose a été mesurée sur des échantillons non hydrolysés en utilisant des méthodes au phénol et à l'anthrone. (JP Latgé et al, Can. J. Microbiol. 30, 1507, 1984). La composition en monosaccharide a été déterminée après méthanolyse (HCl 0,5M/méthanol pendant 24 heures à 80°C). Les méthylglycosides ont été identifiés sous forme de dérivés trifluoroacétylés par chromatographie en phase gazeuse et liquide selon la méthode décrite par Zanetta et al (J. Chromatog. 69, 291, 1972).

b) Méthylation.

L'acétolyse et l'oxydation périodique des échantillons d'exopolysaccharide ont été réalisées comme décrit par Dubourdieu et al. (Carbohydr. Res. 93, 294, 1981).

Des échantillons d'exopolysaccharides intacts ou ayant subi une acétolyse ou une oxydation périodique ont été méthylés par la méthode décrite par Finne (Carbohydr. Res. 80, 336, 1980) puis méthanolysés avec un mélange méthanol/HCl 0,5M à 80°C pendant 24 heures.

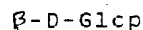
Les dérivés méthylés sont identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse comme décrit par Fournet et al (Anal. Biochem. 116, 486, 1981) : colonne OV 101 30 m x 0,30 mm, 110 à 230°C 2° par minute; mode d'ionisation électronique avec un potentiel d'ionisation de 70 eV.

5

c) Analyse enzymatique.

Le glucane peut être dégradé par un extrait de Trichoderma (Novozym 1161). La digestion enzymatique du glucane nécessite la présence simultanée d'exo et d'endo (1→3) glucanase. L'adjonction de (1→6) glucanase, accélère la dégradation (compositions enzymatiques préparées selon le protocole décrit par Dubourdieu, Thèse Université de Bordeaux, 1982).

Les exopolysaccharides comprennent des chaînes de type bêta (1→3)(1→6) glucane de formule :

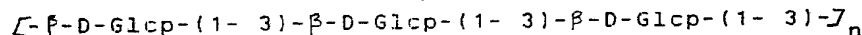


1

⋮

↓

6



Il existe aussi des liaisons interchaînes ainsi que le prouve l'identification de 4,6-diméthylglucopyranoside et de 4- et 6-monométhylglucopyranosides dans les produits de méthylation après méthanolyse.

La présence de mannanes a aussi été détectée dans certaines préparations d'exopolysaccharides. Les chaînes principales contiennent des mannoses liés en 1→2, 1→3 et 1→6. Les branchements entre chaînes sont au niveau des carbones 2 et 6 de résidus mannose. Le pourcentage de mannane varie suivant les souches et les opérations entre 0 et 75 % des exopolysaccharides.

La masse moléculaire des exopolysaccharides est $> 2 \cdot 10^6$. Ainsi sur Superose 6, les exopolysaccharides sont élués à l'exclusion au même endroit que le dextrane de référence T2000 (ayant une masse moléculaire voisine de 2×10^6).

En microscopie électronique à transmission

(ombrage C-Pt à 5-7° après incubation des sucres en présence d'acétate d'uranyle), les exopolysaccharides dans leur milieu de culture apparaissent comme un faisceau de plusieurs fibrilles (largeur totale comprise entre 2 et 4 nm, longueur impossible à mesurer) résultant de l'accouplement de fibrilles. Cet arrangement fibrillaire explose après ultrasonication des exopolysaccharides.

Solubilité des exopolysaccharides :

A saturation, après filtration stérilisante sur filtre 0,45 um, la solubilité est de 600-700 ug/ml d'eau ou d'eau physiologique (NaCl 0,9%).

4. Activité biologique.

Les exopolysaccharides ont des propriétés antitumorales dues à une stimulation globale du système immunitaire.

a) Activité antitumorale.

Les exopolysaccharides à activité antitumorale ont été inoculés chaque jour à des souris avant inoculation de la tumeur à partir de J-11 jusqu'à J-1 ou après inoculation de la tumeur de J+1 à J+11.

- Sarcome 180/CD1

A J+30, pour des doses de 0,2 à 5 mg/kg d'exopolysaccharides de Nomuraea rileyi, la tumeur est totalement inhibée. Dans les animaux témoins, la tumeur pèse 4,2 g. L'inhibition totale de la tumeur nécessite des doses de schizophyllane de 1 à 5 mg/kg. A 0,2 mg/kg de schizophyllane, l'inhibition de la tumeur est voisine de 60 à 70%.

- Fibrosarcome DBA₂/McSc1

A J+38, le poids de la tumeur des animaux témoins est 4,2 g, celui de ceux traités par le schizophyllane 5 mg/kg est de 2,9 g (toutes les souris ayant la tumeur). En revanche cinq animaux sur 10

traités avec 5 mg/kg de l'exopolysaccharides de Nomuraea rileyi ne présentent plus de tumeur (poids moyen de la tumeur sur tous les animaux traités : 0,9 g).

b) Activité anti-microbienne

5 les exopolysaccharides de Nomuraea rileyi ont été inoculés à des souris Swiss à la dose de 1 mg/kg à J-7, J-3 et J-1 avant inoculation de Aspergillus fumigatus et Candida albicans.

10 A J+15, 9 souris/10 du lot témoin sont tuées par Aspergillus fumigatus alors que 3/10 seulement sont mortes dans le lot où les souris ont reçu l'exopolysaccharide de Nomuraea rileyi.

15 A J+15, 8 souris/10 sont tuées par Candida dans le lot témoin alors que 1 souris/10 seulement est morte dans le lot ayant reçu les 3 injections de l'exopolysaccharide de Nomuraea rileyi.

REVENDICATIONS

1. Exopolysaccharides fongiques ayant une activité immunostimulante, comprenant des chaînes de type glucane de formule

5

 β -D-Glcp
$$\begin{array}{c} 1 \\ \downarrow \\ 6 \end{array}$$

$$[-\beta\text{-D-Glcp-(1-3)}-\beta\text{-D-Glcp-(1-3)}-\beta\text{-D-Glcp-(1-3)}-]_n$$

10

qui présentent entre elles des pontages, et éventuellement des chaînes de type mannane et ayant une masse moléculaire au moins égale à $5 \cdot 10^5$.

15

2. Exopolysaccharides selon la revendication 1, qui sont produits par Nomuraea rileyi.

20

3. Procédé d'obtention d'un exopolysaccharide selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il consiste à cultiver une souche productrice de l'exopolysaccharide, à séparer par filtration le milieu de culture et à séparer par précipitation ou ultrafiltration les exopolysaccharides du milieu de culture.

25

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'on effectue une culture de Nomuraea rileyi dans un milieu de culture comprenant de 3 à 6% en poids de glucose et 1 à 2% en portion d'extrait de levure.

30

5. Procédé selon la revendication 3 ou la revendication 4, caractérisé en ce qu'on sépare les exopolysaccharides du milieu de culture par précipitation par l'éthanol.

35

6. Composition thérapeutique comprenant à titre de principe actif un exopolysaccharide selon la revendication 1 ou la revendication 2.